©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Über die Eigenfluoreszenz lebender, absterbender und toter Florideenzellen

Von Christian Wimmer und Karl Höfler.

Mit 3 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 17. Dezember 1953)

Im Rahmen umfangreicher Untersuchungen über Eigenfluoreszenz an lebenden Pflanzen wurden 1933 auch lebende Florideen untersucht, die Höfler kurz vorher aus Griechenland mitgebracht hatte[1]. Die damals geprüften Rotalgen gehörten drei Familien der Ordnung der *Ceramiales* an; es waren folgende Gattungen und Arten: *Delesseriaceae: Nitophyllum punctatum* (Stackh.) Grev. — *Rhodomelaceae: Polysiphonia sertularioides* (Grat.) J. Ag., *Polysiphonia* sp., *Heterosiphonia* Mont. sp. — *Ceramiaceae: Griffithsia Schousboei* Mont., *Griffithsia* Ag., zwei sp., *Callithamnion* Lyngb., zwei sp., *Antithamnion cruciatum* (Ag.) Naeg.

Die an diesem Material gemachten Beobachtungen ließen den Wunsch entstehen, noch weitere Fluoreszenzstudien an frischen Algen durchzuführen. Zu solchen ist es aber vor dem Kriege nicht mehr gekommen. Erst im März 1953 erhielten wir durch die Post aus Neapel Material von *Antithamnion cruciatum*, das im UV-Licht untersucht werden konnte. Die alten Protokolle wurden hervorgeholt, und so entstand diese kleine Arbeit. Zu Ende August 1953 sammelte dann noch Höfler in Helgoland einige Arten, die frisch

[1] Die Algen waren von Höfler auf der Reise der Wiener Universität gesammelt worden:

Am 17. April 1933 bei Nauplia an der Ostküste des Peloponnes (Hafenstadt vor Mykene) am Felsenufer südlich vom Hafen.

Am 18. April 1933 in Santorin (Vulkaninsel zwischen dem Peloponnes und Kreta), Felsenufer und Grotte nördlich vom Hafen.

Am 20. April 1933 bei Katakolon an der Westseite des Peloponnes, Innenseite der Hafenmauer.

Die Algen wurden in großen Standgläsern auf dem Verdeck des Schiffes schattig gehalten, regelmäßig mit neuem Seewasser versorgt und am 25./26. April 1933 von Split in einem offenem Wagen des direkten Zuges bei kühler Witterung, vor jeder Erwärmung geschützt, nach Wien gebracht und weiter im Pflanzenphysiologischen Institut sorgsam gehalten.

im Hamburger Institut für Allgemeine Botanik geprüft wurden (vgl. Höfler u. Düvel 1954).

Unsere Beobachtungen wurden 1933 mit dem Reichertschen Fluoreszenzmikroskop Kam F nach H. Haitinger (vgl. 1938, S. 15), 1953 mit der modernen Reichertschen Lux-UV-Apparatur vorgenommen, welche raschesten Wechsel zwischen Beobachtung im weißen Licht und im ultravioletten Licht bei jeder Vergrößerung zuläßt. In keinem Fall wurden fluorochromierte Präparate untersucht, sondern ausschließlich nur die Eigen-(Primär-)fluoreszenz beobachtet.

I. Beobachtungen.

Nitophyllum punctatum:

Zart rosa gefärbte Thalluslappen wurden untersucht. Die lebenden Zellen waren, entsprechend dem schwachen Farbton, im UV-Licht schwach aufleuchtend matt ziegelrot, die toten Zellen aber grell hellchromgelb. Bei starkem Abblenden erschienen die lebenden Zellen ganz dunkel, fast schwarz, während die toten noch immer hellgelb leuchteten.

Um die Veränderungen der Primärfluoreszenz während des Absterbens von *Nitophyllum*-Zellen beobachten zu können, wurde ein zart rosa gefärbter Thalluslappen zunächst in Meerwasser untersucht. Er zeigte zwischen matt ziegelroten, lebenden Zellen einige wenige tote, grell hellchromgelb aufleuchtende Zellen. Nun wurde der Thalluslappen rasch mit destilliertem Wasser abgespült und in destilliertem Wasser weiter untersucht. Bereits nach 24 Sekunden zeigten sich viele gelbe Zellen. Nun wurde im ultravioletten Licht eine große Gruppe matt ziegelrot fluoreszierender, also noch lebender Zellen durch 26 Minuten dauernd beobachtet, bis alle Zellen gelb fluoreszierten, also tot waren.

Nach 2′ 20″: Die Zellen blassen aus, die Farbe ändert sich rasch. Die Zellen der Thallusspitze sind noch unverändert (größere Resistenz der jungen Zellen). Die bereits bei Versuchsbeginn gelben Zellen, die absterbenden Zellen und die lebenden Zellen sind noch scharf unterschieden.

Nach weiteren 1′ 50″: Die Zellen sind noch blasser geworden, jetzt hellbräunlich, die ursprünglich gelben leuchten noch immer heraus. Im weißen Licht ist kein Unterschied zu sehen.

Nach weiteren 3′ 40″: Jetzt sind die beobachteten Zellen nur mehr lichtbraun.

Nach weiteren 50″: Das Ausbleichen erfolgt nun rascher. An einer Stelle sind schon stetige Abstufungen zwischen Hellbraun und Gelb zu erkennen. Die Zellen nahe der Thallusspitze sehen noch immer fast wie lebende aus.

Nach weiteren 2′ 20″: Viele Zellen sind schon recht blaß aber noch bräunlich statt gelb. Der Unterschied im Farbton zwischen den absterbenden Zellen und den noch lebenden Zellen ist jetzt sehr groß.

Nach weiteren 2′ 50″: Der Farbenunterschied ist noch immer vorhanden. Bei starker Vergrößerung erkennt man in den absterbenden Zellen noch immer die Rhodoplasten.

Nach weiteren 2′ 10″: Bei schwacher Vergrößerung scheinen die absterbenden Zellen jetzt auch schon gelb, gegen die Thallusspitzen hin dunkelgelb. Einige überlebende Zellen sehen noch wie ursprünglich aus, erst bei starker Vergrößerung erkennt man Veränderungen, kleine gelbleuchtende Tropfen.

Nach weiteren 9′ 40″: Nun sind alle Zellen gelb, also tot. In den während der Beobachtung abgestorbenen Zellen sind die Rhodoplasten noch als leichte Schattierungen zu erkennen, zum Unterschied von den schon bei Versuchsbeginn toten, gelbleuchtenden Zellen. Der gelbe Farbton ist aber jetzt bei beiden Zellen gleich. Einige Zellen sind aber noch immer dunkel — nach mehr als 26 Minuten.

Die grell hellchromgelbe Primärfluoreszenz der toten Zellen ist bei dieser Rotalge besonders gut von der matt ziegelroten Fluoreszenz der lebenden Zellen zu unterscheiden. Dort ist die Fluoreszenz so stark, daß sie auch im auffallenden Tageslicht erkennbar ist. Molisch (1897, S. 39) hat bei seinen Gefrierversuchen die Verfärbung von *Nitophyllum* als ein sicheres Zeichen des Todes benützt. Fror die Alge bei — 5° C ein, so wurde sie orangerot, woraus folgt, daß der Tod schon im gefrorenen Zustand und nicht erst beim Auftauen erfolgt. Höfler (1931) sagt von ihr: „Die Alge ist im Leben rot bis bräunlichrot, wird beim Tode matt ziegelrot und beginnt zu fluoreszieren, später bleichen die Thalli langsam aus.“ „Die Verfärbung im Tode beruht bekanntlich darauf, daß der rote Farbstoff aus den Chromatophoren in den Zellsaft übertritt. Im Leben ist der Phykoerythrinfarbstoff auf die Chromatophoren lokalisiert, und die Alge erscheint makroskopisch klar durchscheinend rot. Nach dem Tode tritt er in den Zellsaft, die wässerige Lösung fluoresziert, und die Algen erscheinen trüb orange oder ziegelrot.“ Unsere Beobachtungen im Fluoreszenzmikroskop haben diese Befunde bestätigt. In den lebenden Zellen von *Nitophyllum* sind die matt ziegelrot fluoreszierenden Rhodoplasten auf optisch leerem Grund bei starker Abblendung nur noch schwach wahrzunehmen, in den toten Zellen entsteht zunächst diffus eine grell hellchromgelbe Primärfluoreszenz, die auch bei starker Abblendung sehr deutlich bleibt.

Antithamnion cruciatum:

Das Material 1933 enthielt einige Blasenzellen, das Material 1953 viele Blasenzellen und zahlreiche Tetrasporangien in allen Entwicklungsstadien. Abb. 1 zeigt einen Zweig des Algenräschens, der einige Blasenzellen und ein Tetrasporangium trägt, Abb. 2 Blasenzellen und Tetrasporangien verschiedenen Alters. Blasen-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

zellen wurden erstmals von Naegeli (1861) bei *Antithamnion* als „abortierte Sporangien" besprochen. Ausführlich behandelt sind sie in einer Arbeit Biebls (1939, S. 455) und weiter bei Schiffner und Biebl (1944, S. 99). Die Blasenzellen enthalten vorwiegend eiweißartige Stoffe, wie von Nestler bereits 1900 erwähnt. Sie zeigen nach Biebl starke Empfindlichkeit gegen Hypotonie (sogar Platzen in Süßwasser), aber hohe Hypertonie-

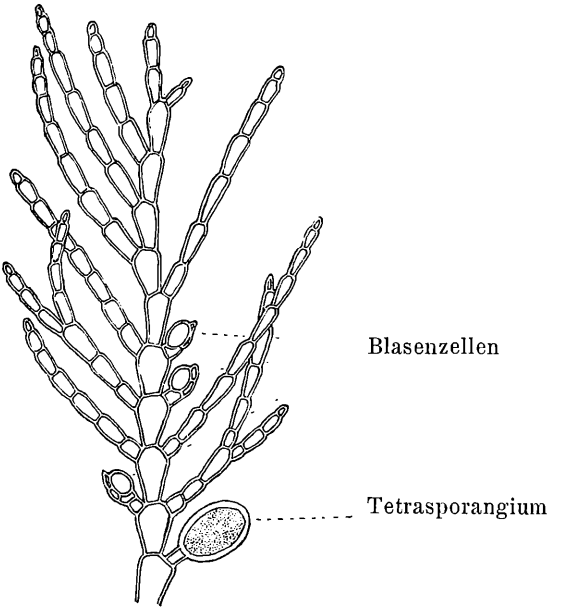

Abb. 1. *Antithamnion cruciatum.*

resistenz. Erwähnenswert ist, daß von einigen Autoren Jod- bzw. Bromanreicherung in den Blasenzellen angegeben wird. Die Tetrasporangien der Gattung *Antithamnion* können tetraedrisch, kreuzförmig oder zonenförmig geteilt sein.

Nach unseren Protokollen von 1933 erscheinen im UV-Licht die Rhodoplasten in den lebenden Zellen mennigrot; an toten Zellen leuchtet der gesamte Inhalt hellchromgelb. Die Blasenzellen sind optisch leer, ihre Membran leuchtet zart himmelblau.

Am 1953 untersuchten Neapeler Material wurden die Rasen sorgfältig zerteilt und die verzweigten Einzelzellen untersucht. An

ihrem Grund lagen oft Anhäufungen von Tetrasporangien und an den opponiert oder einseitig gefiederten Ästchen häufig die arttypischen Blasenzellen. Beide waren fast in allen Entwicklungsstufen vorhanden. Der Zellinhalt zeigte anfangs nur in einigen Hauptfadenzellen Degenerationserscheinungen, nach einigen Tagen verbreiteten sich diese vom Hauptfaden in die Ästchen und distal fortschreitend in diesen weiter, bis endlich nur mehr wenige Zellen der Spitzen der Endfiederchen unverändert aussahen. Erfahrungsgemäß zeigen ja bei Rotalgen oft die jüngsten Zellen die höchste Resistenz gegen verschiedene schädliche Einflüsse (Child 1916,

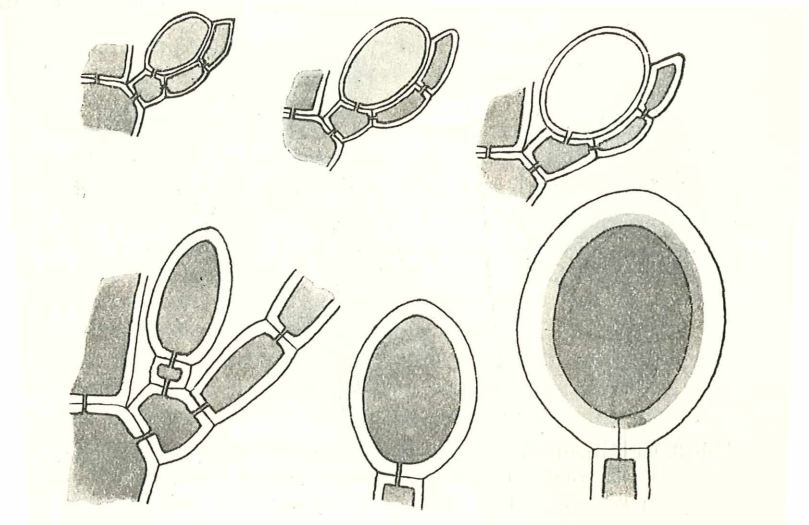

Abb. 2. Oben Blasenzellen verschiedenen Alters, unten Tetrasporangien verschiedenen Alters.

Kylin 1927, Biebl 1937 a, 1939 b). Noch resistenter waren aber die Tetrasporen in den reifen Tetrasporangien, die manchmal noch völlig unverändert aussahen, wenn sogar die jüngsten Zellen am gleichen Ästchen bereits Anzeichen von Degeneration zeigten. Hingegen degenerierten die Blasenzellen rascher.

Im weißen Licht erschienen bei schwacher Vergrößerung anfangs die Inhalte aller Zellen rosa, später orangebraun, endlich olivgrün, am dunkelsten die reifen Tetrasporen. Nur die Blasenzellen waren anfangs körnig und farblos, voll entwickelte waren klar, sehr stark lichtbrechend und farblos, gelblich oder auch grünlich. Die Zellwände aller Zellen waren ungefärbt oder etwas gelblich. Bei

starker Vergrößerung erkannte man, daß die Rhodoplasten anfangs allein rosa gefärbt waren, daß aber mit fortschreitender Degeneration der Farbstoff andere Zellinhalte färbt, daß ferner die Zellwände der Tetrasporangien, auch jüngerer und älterer Hauptfadenzellen, zweischichtig sind.

Im UV-Licht zeigten schon bei der ersten Untersuchung des noch ziemlich frischen Materials die im Tageslicht einheitlich rosa erscheinenden Zellen ein ungemein farbenprächtiges Bild: Die intakt aussehenden Zellen ließen auf optisch fast leerem Grund die mennigroten Rhodoplasten erkennen. Die Inhalte anderer Zellen leuchteten zur Gänze graugelb bis grell hellchromgelb mit

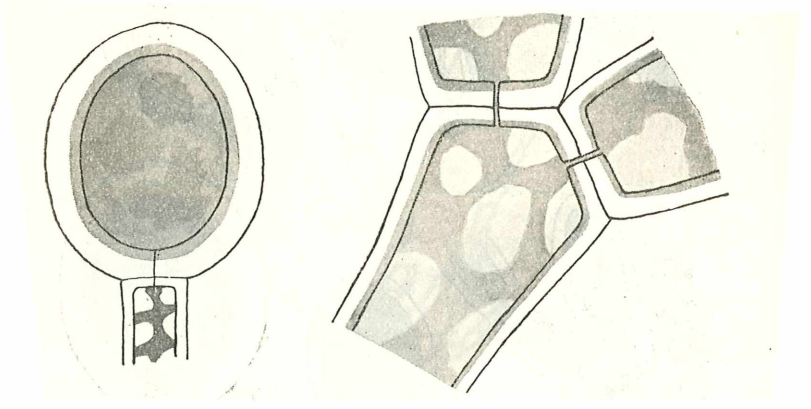

Abb. 3. Zerfallserscheinungen im Zellinhalt eines erwachsenen Tetrasporangiums und alter Fadenzellen.

verblassenden Schatten der Rhodoplasten. In ganz vereinzelten Zellen leuchteten die Inhalte schwach tintenblau oder waren optisch leer. Der Inhalt junger Tetrasporen war menniggelb, heranreifender orangerot und ausgereifter grell feuerrot (Resistenzunterschied!). Der Inhalt junger Blasenzellen erschien gelblichgrau, älterer optisch leer oder tintenblau. Ebensolche Farbe zeigten auch Zellen einiger Hauptfäden. (Die Chromatophoren einiger lebender Diatomeen leuchteten blutrot.) Die Zellwände waren meist optisch leer, nur die Wände abgestorbener Zellen ohne Inhalt zart kornblumenblau. Interessant waren die Zellwände reifer Tetrasporangien und ganz alter Hauptfadenzellen: die innere Zellwandlamelle leuchtete mehr oder weniger stark graugelb, die äußere war dunkel. Beim Absterben wurde das Leuchten der Innenlamelle stärker, und auch die Außenlamelle

begann in gleicher, Farbe aber schwächer zu leuchten. — Kylin (1937) sagt: „In den Zellwänden der Rhodophyceen (s. l. Bangiales und Florideae) sind im allgemeinen zwei verschiedene Schichten gut erkennbar, von denen die innere aus Zellulose, die äußere aus Pektinverbindungen besteht.“[2] Nach Bünning (1935) hebt sich bei *Callithamnion roseum* „innerhalb der Zellwand deutlich eine innere Lamelle ab, deren Dicke etwa ein Viertel bis ein Drittel der gesamten Wanddicke beträgt, und diese Lamelle zeichnet sich durch intensive Färbbarkeit mit Methylenblau (0,01%ige Lösung) aus, während der übrige Teil der Zellwand fast ungefärbt bleibt“. Dies spricht wohl für erhöhten Pektingehalt der inneren Zellwandlamelle. Bünning beobachtete auch, daß kurze Zeit nach dem Zelltod, wenn der Farbstoff aus den Chromatophoren austritt, auch die äußere, sonst nicht färbbare Lamelle mit Methylenblau färbbar wird.

Ob bei *Antithamnion* eine gelbe zarte äußere Begrenzung dieser Zellen nur auf Reflexwirkung der grell hellgelb leuchtenden Zellinhalte toter Zellen beruhte oder auf dem Selbstleuchten einer sehr zarten äußeren Membranschicht (Kutikula), konnte nicht entschieden werden. Mit fortschreitendem Absterben nahm die Zahl der Zellen mit leuchtendem Inhalt stark zu. Endlich strahlten die Inhalte fast aller Zellen in grellem Hellgelb; nur die reifen Tetrasporen leuchteten noch immer grell feuerrot, die jungen jetzt auch hellgelb. Zuletzt verblaßte das Leuchten, d. h. es leuchteten in den Fadenzellen nicht mehr die ganzen Inhalte, sondern nur noch eigentümlich geformte Reste; vielleicht handelt es sich um die Inhalte geschrumpfter Vakuolen (Abb. 3). Auch das Feuerrot der Tetrasporen wich einem leuchtendem Hellgelb, worin zuerst noch feuerrote Wölkungen zu erkennen waren, die aber immer mehr verschwanden.

Von den 1933 geprüften Florideen aus Griechenland seien noch folgende genannt:

Polysiphonia sertularioides: In den lebenden Zellen erscheinen im Fluoreszenzmikroskop die Chromatophoren mennigrot auf dunklem, optisch leerem Grund.

Polysiphonia sp.: Die lebenden Zellen fluoreszieren mennigrot, die toten hell chromgelb.

[2] Bei *Furcellaria fastigiata* sind nach Kylin (1943) die Zellwände aus Zellulose und einem mit Agar-Agar nahe verwandten Membranschleim aufgebaut. „Beide Substanzen sind miteinander gemischt, Zellulose jedoch hauptsächlich in den inneren, der Membranschleim hauptsächlich in den äußeren Teilen der Zellwände.“

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Heterosiphonia sp. (aus Nauplia): Die Plastiden sind in intakten Zellen mennigrot, alles andere ist farblos. Bei verletzten Fäden ist der Zellinhalt blau, auch wenn die mennigroten Chromatophoren noch erhalten sind; anscheinend ist das Blau auf die Vakuolen beschränkt. Die Erscheinung bleibt an frischem, reicherem Material zu untersuchen.

Griffithsia Schousboei und zwei weitere *Griffithsia* sp.: Die lebenden Zellen sind im UV-Licht matt orangerot (etwa wie tote Zellen im Weißlicht), die toten Zellen grell hellgelb. Der Unterschied ist hier besonders auffällig.

Callithamnion sp. (aus Katakolon): Bei schwacher Vergrößerung erscheinen lebende Zellen mattrot, tote Zellen gelb, in leeren ist die Zellwandung himmelblau. Bei mittlerer Vergrößerung erkennt man in den lebenden, mattroten Zellen die bläulich grauen Kerne, bei starker erkennt man die mennigroten Chromatophoren. In den grell hellchromgelb aufleuchtenden toten Zellen sieht man im Inneren einen helleren Sack (den geschrumpften Protoplasten oder den Tonoplasten mit seinem Inhalt?).

Bei der Braunalge *Ectocarpus olympiacus* aus Katakolon (det. Professor V. Schiffner) leuchten im Fluoreszenzlicht die Chromatophoren — wie bei anderen Phaeophyten — alle dunkelblutrot, also ganz so wie bei Diatomeen oder bei Grünalgen. Ein kleiner Rotalgenkeimling, der am *Ectocarpus* aufsaß, war abgestorben und leuchtete hell chromgelb.

Aus der Klasse der *Bangiales* fand sich in einem Material ein einzelner Faden von *Bangia ceramicola* (Lyngb.) Chauv. mit sternförmigen Chromatophoren. Er zeigt im UV-Licht ebenfalls mennigrote Fluoreszenz der lebenden und grell hellchromgelbe Fluoreszenz der toten Zellen.

Im Sommer 1953 ergab sich die Gelegenheit, frisches Helgoländer Rotalgenmaterial im Hamburger Institut für Allgemeine Botanik fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Die Befunde werden im einzelnen an anderen Orten beschrieben (Höfler u. Düvel 1954). Unsere Grundbeobachtung konnte an 5 weiteren Arten — den Florideen *Delesseria alata* (Huds.) Lamour (= *Membranoptera alata* Kylin), *Delesseria sanguinea* Lamour (= *Hydrolapathum sanguineum* [L.] Stackh.), *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. und den Bangieen *Bangia atropurpurea* und *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. f. *laciniata* (Lighlf.) J. Ag. — bestätigt werden. Zellen mit lebenden Rhodoplasten fluoreszieren matt mennigrot, tote Zellen grellgelb.

Bei vielen Arten hat sich also gezeigt, daß lebende und tote Zellen im weißen Licht schwer zu unterscheiden sind, absterbende wohl überhaupt nicht zu erkennen sind, daß aber die Eigenfluores-

zenz außerordentlich verschieden ist. Es läßt sich daher an den untersuchten Arten im UV-Licht auf einen Blick erkennen, ob ihre Zellen lebend sind, ob sie abzusterben beginnen, ob sie tot sind.

II. Besprechung.

a) Zur Literatur.

Seit langer Zeit ist bekannt, daß die wäßrigen Lösungen von Phykoerythrin und Phykocyan im auffallenden kurzwelligen bzw. UV-Licht lebhaft fluoreszieren. Nach Kylin erscheint reine Phykoerythrinlösung im durchfallenden Licht bei geringer Konzentration karminrot mit leicht violettem Ton, bei höherer spielt die Farbe nach Orange. Die Lösung von Florideen-Phykocyan (aus *Ceramium rubrum*) zeigt eine stark dunkel karminrote Fluoreszenz und ist im durchfallenden Licht indigoblau, bei starker Konzentration violett bis rotviolett.

Die Plastiden der Rhodophyten enthalten bekanntlich sowie die der grünen Pflanzen die alkohollöslichen Farbstoffe Chlorophyll a (vielleicht auch Chlorophyll d), Karotin und Xanthophyll und dazu die wasserlöslichen Farbstoffe Phykoerythrin und Phykocyan. Die Eiweißnatur dieser beiden hat Molisch (1894, 1895) nachgewiesen; er hat auch beide zum Kristallisieren gebracht. Reine Lösungen beider Pigmente wurden zuerst von Kylin (1910) hergestellt, der uns auch in seiner „Anatomie der Rhodophyceen“ (1937) die beste zusammenfassende Darstellung unter Berücksichtigung der gesamten Literatur bis 1935 gegeben hat. Er hat die beiden chemisch verwandten Farbstoffe als Phykochromoproteide zusammengefaßt. Seit Lemberg (1929) zu dem Ergebnis kam, daß die prosthetischen Gruppen den Gallenfarbstoffen nahestehen, sind die Chromoproteide auch als Phykoerythrobilin und Phykocyanobilin und beide zusammen als Phykobiline bezeichnet worden.

Auf Kylins Anregung hat sich The Svedberg (1928 bis 1932) eingehend mit der Bestimmung des Molekulargewichtes beider Proteide beschäftigt. Er hat im Upsalienser Laboratorium seine Methoden der Ultrazentrifugierung (Sedimentationsgleichgewicht und Sedimentationsgeschwindigkeit) zur Anwendung gebracht. Er erhält für das Phykoerythrin der Florideen als wahrscheinlichen Wert ein Molekulargewicht von 208.000 ± 8000. Die Angaben beziehen sich auf wäßrige Lösungen von Phykoerythrin, das mit Ammoniumsulfat gereinigt worden war. Svedberg glaubt annehmen zu dürfen, daß das natürliche Phykoerythrin in

bezug auf das Molekulargewicht wahrscheinlich mit dem gereinigten Produkt übereinstimmt. An einem Originalpräparat Kylins, welches 17 Jahre lang in kristallisierter Form unter gesättigter Lösung von $(NH_4)_2SO_4$ aufbewahrt worden war, zeigten 67% der Moleküle noch das Molekulargewicht 208.000, 33% ein kleineres (wahrscheinlich ein Sechstel oder ein Achtel). Bei *Ceramium rubrum* war das Molekulargewicht von Phykoerythrin zu 207.700, das des gleichzeitig anwesenden Phykocyans zunächst zu 106.000 ± 5000 bestimmt worden. Nach späterer Bestimmung (1932) wäre aber auch das Molekulargewicht des Phykocyans 209.000 bei mittlerem p_H-Bereich, während die Moleküle bei extremerem p_H zerfallen und im Übergangsbereich das halbe Molekulargewicht vom normalen zeigen. Von Mittelmeeralgen hat Svedberg in Neapel *Bornetia secundiflora* (J. Ag.) Thur., *Griffithsia furcellata* J. Ag. und *Sebdenia monardinia* (Mont.) Berth. untersucht, welche trotz ihrer wesentlich anderen Lichtabsorption (Gaetano 1926) doch bei UV-Bestrahlung Licht von gleicher Wellenlänge zeigten; es dürfte sich bloß um Intensitäts-, nicht um qualitative Unterschiede gegenüber den Chromoproteiden von *Ceramium* handeln. — Der IEP liegt nach Tiselius' Bestimmungen für Phykoerythrin bei p_H 4,3, für Phykocyan bei p_H 4,5.

Dem Gedanken Svedbergs, daß die Phykochromoproteide im wesentlichen Polymere des Ei-Albumins vom Molekulargewicht 34.500 darstellen, hätte wohl auch zur Zeit der Svedbergschen Arbeiten kein Botaniker zugestimmt; auch bleibt die wesentliche Eigenschaft der Strahlenabsorption bei dieser Vorstellung unberücksichtigt. Lembergs Ergebnis, wonach die prosthetischen Gruppen der Phykochromoproteide den Gallenfarbstoffen, und zwar dem Biliverdin, nahestehen, hat in der Literatur recht allgemein Eingang gefunden. Es ist dies eine Tetrapyrrolverbindung mit offenem Ring, die sich vom Hämoglobin nur durch den Mangel des Eisenatoms sowie dadurch unterscheidet, daß die α-CH-Brücke zwischen den Pyrrolringen I und II fehlt. Die Pyrrolringe bilden daher nicht wie beim Chlorophyll einen Ring, sondern nur eine Kette. Nach Egle (1953) erbrachten „die Strukturaufklärung des Mesobiliviolins und Mesobilierythrins, der prosthetischen Gruppen des Phykocyans und Phykoerythrins, durch Lemberg und Mitarbeiter sowie die Ergebnisse von W. Siedel (1944) den Beweis, daß diese Verbindungen dem Protoporphyrin 9 in struktureller Beziehung sehr nahestehen, so daß sie sich wahrscheinlich auch in ihrer Genese von diesem ableiten lassen".

Die Verteilung der Absorptionsbänder im Spektrum der wäßrigen Lösung der Phykobiline ist von zahlreichen For-

schern studiert worden. Man stellt die Lösung aus den Meeresalgen so her, daß man frisches Material mit destilliertem H_2O übergießt und bei Zimmertemperatur oder 35—40° C stehen läßt, bis sich der Farbstoff aus der abgestorbenen Algenmasse herauslöst. Kylin setzt nach einem Tag etwas Toluol zu, um Fäulnis zu vermeiden. Nach einigen Tagen wird der Extrakt abfiltriert, mit kristallisiertem Ammoniumsulfat (10—12 g auf 100 cm³) versetzt und über Nacht stehengelassen. Der entstehende Niederschlag besteht hauptsächlich aus Phykoerythrinkristallen. Nach einigem Umkristallisieren mit $(NH_4)_2SO_4$ erhält man reines Phykoerythrin. Wird der übrigbleibende Extrakt neuerlich mit Ammonsulfat versetzt, so fallen beide Proteide aus. Nach fraktioniertem Umkristallisieren wird auch reines Florideen-Phykocyan gewonnen.

Die Absorptionsspektra zeigen für das Phykoerythrin aus *Ceranium rubrum* drei Bänder im Grün und Blau mit Maxima bei λ 569—565 μμ, λ 541—537 μμ und λ 498—492 μμ. Bei *Polysiphonia* und *Rhodomela* gibt es eine Modifikation, die schwächer fluoresziert, aber ähnliche Absorptionsbänder zeigt. Doch werden die Rhodomelaceen, wenn sie in Süßwasser absterben, makroskopisch gesehen, nicht orangegelb wie die übrigen Florideen. Andere Modifikationen mit nur zwei Absorptionsbändern (Band 3 und 1 entsprechend) finden sich bei Neapler Material von *Sebdenia monardinia*. Daß die wäßrigen Auszüge aus verschiedenen Neapler Rotalgen am Tageslicht ganz verschiedene Färbung haben, hat schon Gaetano gezeigt; doch sollen sie, wie erwähnt, ein Fluoreszenzlicht von etwa gleicher Wellenlänge geben. Die roten (Meeres-) Cyanophyceen enthalten nach Boresch (1921) eine besondere Phykoerythrinmodifikation, die nur ein Band im Grün mit dem Maximum um λ 550 μμ zeigt. —

Daß die Chromoproteide bei der Absorption der photosynthetisch wirksamen Strahlen die wichtigste Rolle spielen, steht heute wohl außer Zweifel (Montfort, Seybold, Seybold u. Egle, Seybold u. Weissweiler). Kylin hielt noch 1937 für wahrscheinlich, daß das Phykoerythrin nur einen optischen Sensibilator darstellt, und er glaubte die Möglichkeit, daß es in derselben Weise wie Chlorophyll assimilierend wirkt, ausschließen zu können. Dagegen gelangen Haxo und Blinks (1950), denen wir die eingehendste und methodisch exakteste Untersuchung über Absorption und Assimilation von Meeresalgen im sichtbaren Spektrum verdanken, zu dem Ergebnis, daß der Gehalt an wasserlöslichen Phykoproteiden die photosynthetische Leistung bestimmt. Für Rotalgen, die nur Phykoerythrin, kein Phykocyan enthalten (*Delesseria, Schizymenia,*

Porphyrella) fällt die Kurve der Assimilation und Lichtabsorption im mittleren Teil des sichtbaren Spektrums zusammen, und beide Kurven zeigen übereinstimmende Gipfelpunkte bei 495, 540, 565 $\mu\mu$. Vgl. die Diagramme bei Haxo und Blinks S. 411—417. Das Chlorophyll — das ja in den Rotalgenplastiden oft recht reichlich vorhanden ist (Seybold u. Egle 1938) — wird dagegen überraschenderweise für die O-Produktion nur wenig ausgenützt. Die photosynthetische Leistung der genannten Rotalgen bleibt bei 440 $\mu\mu$ und bei 675 $\mu\mu$ minimal, wo doch das Chlorophyll am stärksten absorbiert und daher die Absorptionskurve der intakten Thalli relative Maxima zeigt.

Haxo und Blinks berühren die Frage, ob die Strahlenabsorption von Extrakten der Absorption im intakten Algenthallus entsprechen müsse. „It must be admitted, in the case of the fat-soluble pigments, that the relative absorption by chlorophylls and carotinoids found in extracts may bear little relation to that obtaining in the cell: thus, this uncertainty prevails in appraising the role of carotinoids in photosynthesis. Fortunately, the absorption characteristic of the phycobilins are much the some in aqueous extracts and in the living thallus and a more direct comparison seems permissible. On the other hand, quantitative extraction and estimation of the water-soluble pigments are not as feasible.“

b) Diskussion.

Hier müssen nun unsere Befunde eintreten. Die Fluoreszenz des Phykoerythrins bzw. der Rhodoplasten innerhalb der Zelle war wohl vor unseren Versuchen von 1933 noch nicht beobachtet worden. Denn Kylin, Lemberg und Svedberg haben nicht mit dem Fluoreszenzmikroskop gearbeitet. Auch aus neuerer Zeit sind uns mikroskopische Befunde zur Frage nicht bekannt.

Das Überraschende an unserer ersten Beobachtung war ja nicht so sehr die Tatsache, daß der beim Zelltode in den Zellsaft austretende Phykoerithrinfarbstoff im UV-Mikroskop dieselbe grellgelbe Fluoreszenz aufweist, die makroskopisch von wäßrigen Auszügen so wohlbekannt ist, als vielmehr die Tatsache, daß der Farbstoff innerhalb der lebenden, intakten Plastiden der Rotalgen, mikroskopisch betrachtet, noch nicht gelb fluoresziert.

Man könnte an verschiedene Ursachen denken. Das gleichzeitig vorhandene Chlorophyll könnte die Eigenfluoreszenz des Phykoerythrins überstrahlen. Gegen diesen einfachen Erklärungsversuch spricht aber schon, daß das Algenrot, wenn es in den Zell-

saft übertritt und dabei noch vielfach verdünnt wird, doch so intensiv in chromgelber Farbe leuchtet, daß es die Rotfluoreszenz der chlorophyllhaltigen, im Weißlicht grünen Plastidenreste weit überstrahlt. — Es ließe sich ferner an Fluoreszenzlöschung durch hohe Konzentration denken, aber für eine solche Annahme spricht wohl nichts.

Am wahrscheinlichsten ist, daß der Phykoerythrinfarbstoff erst in dem Moment seine gelbe Fluoreszenz annimmt, wo er in wäßrige Lösung tritt. Dafür sprechen auch neue Beobachtungen an Helgoländer Rotalgen vom Sommer 1953. In Süßwasser gebracht, sterben die Thalli von *Delesseria sanguinea, D. alata* und *Bangia atropurpurea* — dank ihrer geringeren Hypotonieempfindlichkeit (Biebl 1937) — viel langsamer ab als z. B. *Nitophyllum punctatum*, dessen Nekroseablauf in H_2O im Tageslichtmikroskop schon früher in Neapel ausführlich studiert wurde (Höfler 1931). Bei den Delesserien und bei *Bangia* schwellen im Süßwasser die roten Plastiden erst stark auf und bleiben dabei noch rot im UV-Licht. Im Verlauf der Nekrose tritt dann die gelbe Fluoreszenz zuerst in den Plastiden auf (vgl. Höfler und Düvel 1954). Der Wechsel der Fluoreszenzfarbe erfolgt also schon innerhalb der Plastiden und vollzieht sich wohl in dem Augenblick, wo hier bei der Nekrose durch Entmischung wäßrige Phase frei wird. Wenn dann die Plastiden platzen, teilt sich die grellgelbe Fluoreszenz dem ganzen, von wäßriger Lösung erfüllten Zellsaftraum mit.

Der in den intakten Plastiden enthaltene Farbstoff zeigt die gelbe Fluoreszenz noch nicht. Daraus folgt aber wohl, daß er in physikalisch-chemischer Hinsicht anders beschaffen ist als der ausgetretene bzw. extrahierte Farbstoff. Nur auf diesen beziehen sich aber alle bisherigen chemischen Untersuchungen.

Wir wissen heute nicht, wie das Phykoerythrin natürlicherweise im Stroma der Rotalgenplastiden gebunden ist. Die Beobachtungen vieler Forscher haben (Kylin 1937, S. 14) „zur Auffassung geleitet, daß sich die Chromatophoren der Florideen fast im flüssigen Aggregatzustand befinden“ (Küster 1904, 1951, S. 363 f., Liebald 1913, Höfler 1931, 1937, Biebl 1936 f.). Der an *Antithamnion cruciatum* geführte Nachweis vital reversibler osmotischer Volumsschwankungen der Plastiden (Höfler 1931, S. 61) könnte zur Vorstellung Anlaß geben, daß wäßrige Phase schon in den intakten Plastiden vorhanden wäre und daß in ihr die wasserlöslichen Pigmente gelöst wären. Die beschriebenen Beobachtungen widerlegen eine solche Vorstellung, denn

beim Übergang von der natürlichen Bindung im Plastidenstroma zum wassergelösten Zustand tritt ja die Gelbfluoreszenz erst auf. Welcher Art die mit diesem Übergang verbundenen physikochemischen Veränderungen des Phykoerythrinfarbstoffes sind, bleibt aufzuklären.

Unsere Auffassung wird gestützt durch jüngste orientierende Versuche vom Dezember 1953. *Delesseria alata* aus Helgoland stand im Wiener Institut noch in gutem Zustand zur Verfügung. Lebende, intakte Zellen waren im UV-Licht mennigrot, im Süßwasser stellte sich, wie am frisch gesammelten Material, von der Schnittfläche fortschreitend, grellgelbe Fluoreszenz ein. Wurden solche Thallusstücke in konzentrierten Methylalkohol übertragen, so ging mit der Nekrose eine rasche Welle von Gelbfärbung durch die Thalli. Gleich nachher kehrte die rote Farbe zurück. In abgeschnittenen bandförmigen Thalluslappen nahm der gelbe, nach innen fortschreitende, einige Zellen breite Streifen die Form einer steilen Hyperbel an. Nachher löst sich das Chlorophyll rasch mit leuchtend blutroter Fluoreszenz im umgebenden Alkohol. Die Farbe kontrastiert gegen die matt mennigrote Farbe des Thallus, in welchem das Phykoerythrin zurückgeblieben ist. Bringt man die Thalluslappen direkt in konzentriertes Methanol, so bleiben die Zellen mennigrot, wenn das Chlorophyll blutrot herausgelöst worden ist. Das Phykoerythrin, in Alkohol unlöslich, bleibt also auch in toten Zellen rot, wo es nicht ins wäßrige Medium übertritt. Werden in Alkohol getötete Thallusteile nachträglich in Wasser überführt, so färben sie sich nicht mehr gelb. Vermutlich ist das Phykoerythrin als Proteid durch die Alkoholwirkung denaturiert worden und so nicht mehr zur Umwandlung in den wasserlöslich gelb fluoreszierenden Zustand fähig.

Es ist also die Gelbverfärbung im UV-Licht eine Todesreaktion, verbleibende Rotfärbung der Thalli aber keine allgemein gültige Lebensreaktion.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang endlich die Feststellung Biebls (1952) über die Absorption verschiedener Meeresalgen im ultravioletten Strahlenbereich. Biebl fand, daß die Absorptionskurven der beiden von ihm untersuchten Florideen *Phycodris* und *Polyneura* im weichen Ultraviolett, d. i. im Wellenlängenbereich von 380—290 $\mu\mu$, ein breites Absorptionsminimum zeigen, während Grün- und Braunalgen (und ebenso *Porphyra*) im gleichen Bereich sogar verstärkt absorbieren. Es wäre zu untersuchen, ob sich nicht intakte Thalli und wäßrige Lösung verschieden verhalten, d. h. ob das wassergelöste, gelb fluoreszierende

Phykoerythrin nicht stärker absorbiert als das native. — Im kurzwelligen, harten UV (290—200 $\mu\mu$) verlaufen nach Biebl die Absorptionskurven der Grün- und Rotalgen flach und annähernd parallel ohne spezifische Unterschiede.

Anmerkung bei der Korrektur:

Aus einer Arbeit von R. W. van Norman, C. S. French and Fergus D. H. MacDowall (1948), die uns erst jetzt zugänglich wurde, geht hervor, daß die Fluoreszenzspektra von intakten Rotalgen und ihren Extrakten sehr verschieden sind. Während die Fluoreszenz des Phycoerythrinextraktes ein Maximum um 575 mμ (und die des Chlorophyllextraktes eines um 707 mμ) hat, ist dieses Phycoerythrinmaximum bei intakten Rotalgen nur schwach ausgebildet. "It must therefore be concluded that the fluorescence spectrum of the phycoerythrin and of the chlorophyll is widely different in the intact algae from its shape in extracts, or that other pigments not present in either the water or the methyl alcohol extracts are causing some of the fluorescence of the intact material." — Unsere mikroskopischen Befunde sprechen — bezüglich des Phycoerythrins — für die erstere Alternative.

Literaturverzeichnis.

Biebl, R., 1936: Untersuchungen an Rotalgen-Plastiden. Protoplasma **26**, 386.

— 1937 a: Zur protoplasmatischen Anatomie der Rotalgen. Protoplasma **28**, 562.

— 1937 b: Ökologische und zellphysiologische Studien an Rotalgen der englischen Südküste. Beih. Bot. Centralbl. Abt. A **57**, 381.

— 1939 a: Zellphysiologische Studien an *Antithamnium plumula* (Ell.) Thuret. Protoplasma **32**, 443.

— 1939 b: Über die Temperaturresistenz von Meeresalgen verschiedener Klimazonen und verschieden tiefer Standorte. Jahrb. f. wiss. Bot. **88**, 389.

— 1952: Ultraviolettabsorption der Meeresalgen. Ber. d. D. Bot. Ges. **65**, 37.

— 1953: Lichttransmissionsänderungen an Meeresalgen, im besonderen an *Porphyra umbilicalis* f. *laciniata*. Österr. Bot. Zeitschr. **100**, 179.

Boresch, K., 1921: Die wasserlöslichen Farbstoffe der Schizophyceen. Biochem. Zeitschr. **119**, 167.

Bünning, B., 1934: Zellphysiologische Studien an Meeresalgen. Protoplasma **22**, 444.

Child, C. M., 1916: Axial susceptibility gradients in Algae. Bot. Gaz. **62**, 89.

Egle, K., 1953: Die Biosynthese der Chlorophyllfarbstoffe. Die Naturwissenschaften **49**, H. 22, 569.

Funk, G., 1927: Die Algenvegetation des Golfs von Neapel. Pubbl. Staz. Zool. Napoli **7**, Supplemento. R. Friedländer, Berlin.

Gaetano, K., 1926: Pubbl. Staz. Zool. Napoli **7**, 77 (zit. nach Svedberg u. Eriksson 1932, S. 4005).

Haitinger, M., 1938: Fluoreszenzmikroskopie. Akad. Verlagsges. Leipzig.

Haxo, F. T. and Blinks, L. R., 1950: Photosynthetic action spectra of marine algae. Journ. Gen. Physiol. **33**, 389.

Höfler, K., 1931: Hypotonietod und osmotische Resistenz einiger Rotalgen. Österr. Bot. Zeitschr. **80**, 51.

— 1937: Vertragen Rotalgen das Zentrifugieren? Protoplasma **26**, 377.

Höfler, K. und Düvel, D., 1954: Helgoländer Algen im Fluoreszenzmikroskop. Ber. d. D. Bot. Ges. **67**, 2.
Küster, E., 1904: Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Pflanzenzelle. Zeitschr. f. allgem. Physiologie **4**, 221.
— 1951: Die Pflanzenzelle, 2. Aufl. G. Fischer, Jena.
Kylin, H., 1910: Über Phykoerythrin und Phykocyan bei Ceramium rubrum (Huds.) Ag. Zeitschr. physiol. Chemie **69**, 169.
— 1912: Über die roten und blauen Farbstoffe der Algen. Ebenda **76**, 397.
— 1927 a: Über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf einige Meeresalgen. Botaniska Notiser Lund 243.
— 1927 b: Über die Blasenzellen der Florideen. Ebenda 275.
— 1931: Einige Bemerkungen über Phykoerythrin und Phykocyan. Zeitschr. physiol. Chemie **197**, 1.
— 1937: Anatomie der Rhodophyceen. Handb. d. Pflanzenanatomie, Bd. VI/2, Borntraeger, Berlin.
— 1943: Zur Biochemie der Rhodophyceen. Kungl. fysiografiska sällskapets i Lund förhandlingar, **13**, Nr. 6.
Lemberg, R., 1928: Die Chromoproteide der Rotalgen I. Liebigs Annalen d. Chemie **461**, 46.
— 1929: Chromoproteide der Rotalgen II. Spaltung mit Pepsin und Säuren. Isolierung eines Pyrrolfarbstoffs. Ebenda **477**, 195.
— 1930: Die Lichtextinktionen der Algen-Chromoproteide. Biochem. Zeitschrift **219**.
Liebaldt, E., 1913: Über die Wirkung wäßriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner. Zeitschr. f. Bot. **5**, 65.
Molisch, H., 1894: Das Phykoerythrin, seine Kristallisierbarkeit und chemische Natur. Botan. Ztg. **52**, 177.
— 1895: Das Phykocyan, ein kristallisierbarer Eiweißkörper. Ebenda **53**, 131.
— 1913. Mikrochemie der Pflanze. 1. Aufl. Jena.
Montfort, C., 1934: Farbe und Stoffgewinn im Meer. Untersuchungen zur Theorie der komplementären Farbenanpassung nordischer Meeresalgen. Jahrb. f. wiss. Bot. **79**, 493.
Naegeli, C., 1861: Beitrag zur Morphologie und Systematik der Ceramiaceae. Sitzungsber. Bayrisch. Akad. Wiss. **1**. München.
Nestler, A., 1900: Die Blasenzellen von *Antithamnion plumula* (Ellis) Thur. und *Antithamnion cruciatum* (Ag.) Näg. Wissensch. Meeresunters. Neue Folge **3**, Abt. Helgoland, 1.
van Norman, R. W., French, C. S. and MacDowall, F. D., 1948: The absorption and fluorescence spectra of two red marine algae. Plant Physiol. **23**, 455.
Schiffner, V. und Biebl, R., 1944: Über die Blasenzellen der Gattung *Antithamnion*. Hedwigia **82**, 99.
Seybold, A., 1934: Über die Lichtenergiebilanz submerser Wasserpflanzen, vornehmlich der Meeresalgen. Jahrb. wiss. Bot. **79**, 593.
— 1936: Über den Lichtfaktor photophysiologischer Prozesse. Ebenda **82**, 741.
Seybold, A. und Egle, K., 1938 a: Quantitative Untersuchungen über Chlorophyll und Karotinoide der Meeresalgen. Ebenda **86**, 50.
— — 1938 b: Lichtfeld und Blattfarbstoffe II. Planta **28**, 87.
— — 1939: Zur Kenntnis des Protochlorophylls II. Planta **29**, 119.
Seybold, A. und Weissweiler, A., 1942: Weitere spektro-photometrische Messungen an Laubblättern und an Chlorophyll-Lösungen sowie an Meeresalgen. Botan. Archiv **44**, 102.

Siedel, W., 1944: Chemie und Physiologie des Blutfarbstoff-Abbaues. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. **77**, 21.
Svedberg, T. and Nichols, I. B., 1927: The application oil turbine type of ultracentrifuge to the study of the stability region of carbon monoxide-hemoglobin. Journ. Amer. Chem. Soc. **49**, 2920—2934.
Svedberg, T. and Lewis, N. B., 1928: The molecular weights of Phycoerythrin and of Phycocyan. Ibidem **50**, 525—536.
Svedberg, T. and Katsurai, T., 1929: The molecular weights of Phycocyan and of Phycoerythrin from Porphyra tenera and of Phycocyan from Aphanizomenon flos aquae. Ibidem **51**, 3573—3583.
Svedberg, T. and Eriksson, I. B., 1932: The molecular weights of phycocyan and of phycoerythrin III. Ibidem **54**, 3998—4010.
Tiselius, 1930: Nova Acta Reg. Soc. Sc. Upsaliensis, (4), 7, Nr. 4 (zit. nach Svedberg u. Eriksson 1932).